

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ DIỆT VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus* CỦA CÁC LOẠI THẢO DƯỢC CHIẾT XUẤT BẰNG QUI TRÌNH TỐI ƯU

Lê Nguyễn Thiên Phúc¹, Nguyễn Minh Thành^{1,*}

¹ Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

*Email: nmthanh@hcmiu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá hiệu quả diệt vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của ba loại thảo dược là trầu không (*Piper betle*), húng quế (*Ocimum basilicum*) và rau má (*Centella asiatica*) được chiết xuất bằng qui trình tối ưu. Ba điều kiện chiết xuất được thử nghiệm nhằm lựa chọn thông số tối ưu bao gồm: i) nồng độ dung môi ethanol (30, 50, 70, 95%); ii) thời gian ngâm mẫu (3, 5, 7, 9 ngày); iii) tỷ lệ giữa khối lượng mẫu thảo dược (g) và dung tích dung môi (mL) (1 : 10, 1 : 20, 1 : 30, 1 : 40). Kết quả nghiên cứu đã xác định được quy trình chiết xuất tối ưu bao gồm các thông số: (i) dung môi ở nồng độ 70%; (ii) thời gian ngâm trong 7 ngày; (iii) tỷ lệ 1 : 30 cho trầu không và húng quế và tỷ lệ 1 : 40 cho rau má. Sau đó, dịch chiết từ quy trình tối ưu được so sánh với dịch chiết từ qui trình chưa tối ưu để xác định đường kính vòng vô khuẩn (ZDI), nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) và khả năng diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đang trong giai đoạn tăng sinh. Quá trình tối ưu đã giúp gia tăng ZDI của dịch chiết trên vi khuẩn lên đến 1,5 lần ($P < 0,05$), cũng như giảm đến 2 lần các thông số MIC và MBC. Ngoài ra, dịch chiết từ qui trình tối ưu cũng giúp giảm đến 10 lần lượng vi khuẩn đang trong giai đoạn tăng sinh ($P < 0,05$) so với dịch chiết từ qui trình chưa được tối ưu. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hiệu quả diệt vi khuẩn của thảo dược từ qui trình chiết xuất tối ưu được gia tăng và tiềm năng sử dụng chúng trong xử lý *V. parahaemolyticus* ở ao nuôi tôm.

Từ khóa: *Vibrio parahaemolyticus*, thảo dược, chiết xuất, tối ưu hoá.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành nuôi tôm ở Việt Nam đóng vai trò quan trọng trong ngành thủy sản, trong đó tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) là đối tượng nuôi chủ lực. Tuy nhiên, nghề nuôi tôm đang đối mặt với nhiều thách thức và mối đe dọa, trong đó có bệnh hoại tử gan tụy cấp do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra. *V. parahaemolyticus* tấn công gan tụy của tôm bằng độc tố PirAB, làm suy giảm chức năng tiêu hóa và miễn dịch, dẫn đến tỷ lệ tử vong cao. Bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) đã xuất hiện ở Việt Nam từ năm 2010, có thể gây chết tôm hàng loạt trong vòng 30 ngày đầu sau khi thả nuôi và đến nay vẫn còn là một thách thức lớn do bệnh lây lan nhanh và khó kiểm soát. Trong khi đó, việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản đang là vấn đề đáng lo ngại do tình trạng

kháng thuốc. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng, *V. parahaemolyticus* ngày càng kháng lại các loại kháng sinh phổ biến như tetracycline, ampicillin và fluoroquinolones do việc lạm dụng sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng, từ đó dẫn đến bùng phát dịch bệnh [1].

Trên thế giới, chiết xuất thảo dược đang được quan tâm như một giải pháp thay thế kháng sinh trong kiểm soát *V. parahaemolyticus* nhờ đặc tính kháng khuẩn tự nhiên. Các hợp chất phenolic, flavonoid và tinh dầu trong trầu không (*Piper betle*) có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gram âm như *V. parahaemolyticus* [2]. Nghiên cứu trên các loại cây thuốc tại Ai Cập và Bangladesh, điển hình như ngải cứu trắng (*Artemisia herba-alba*) và kim ngân (*Lonicera japonica*), đã cho thấy khả năng ức chế *Vibrio* spp.

cũng như tăng cường hệ miễn dịch trên tôm [3]. Các nghiên cứu trong nước cũng đã cho thấy giá trị của chiết xuất một số cây thuốc dân gian trong tiêu diệt *V. parahaemolyticus*, đa phần là trong điều kiện phòng thí nghiệm, điển hình như thầu dầu (*Ricinus communis*) và chùm ngây (*Moringa oleifera*) [4]. Đa số cao chiết thô của các thảo dược được sử dụng tự phát, chưa được thử nghiệm bài bản, ngoại trừ tỏi (*Allium sativum*) là loại thảo dược được chứng minh có hiệu quả cao trong diệt khuẩn [5].

Việc tiếp tục nghiên cứu sử dụng các dịch chiết thảo dược không chỉ giảm sự phụ thuộc vào kháng sinh mà còn hạn chế nguy cơ kháng thuốc trên vi khuẩn. Do đó, việc phát triển phương pháp chiết xuất hiệu quả là cần thiết nhằm gia tăng lượng hợp chất sinh học có hoạt tính cao và có khả năng diệt khuẩn [2].

Nghiên cứu tối ưu hóa qui trình chiết xuất thảo dược ngày càng trở nên cấp thiết nhằm nâng cao hiệu quả kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, các yếu tố như: Loại dung môi, nồng độ, nhiệt độ, thời gian chiết xuất và kỹ thuật hỗ trợ (siêu âm, vi sóng, enzyme) có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu hồi các hợp chất polyphenol, flavonoid và alkaloid. Việc tối ưu hóa các thông số của qui trình chiết xuất có thể tạo ra các loại dịch chiết chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học cao, từ đó giúp cải thiện khả năng phá hủy màng tế bào và ức chế sự phát triển của vi khuẩn một cách hiệu quả hơn [6]. Tuy nhiên, các công bố gần đây tập trung vào việc tìm ra dịch chiết thảo dược và đánh giá hiệu quả của chúng trong kiểm soát *V. parahaemolyticus* mà chưa chú trọng vào việc tối ưu hóa qui trình chiết xuất phù hợp cho từng loại thảo dược. Trầu không (*P. betle*), húng quế (*Ocimum basilicum*) và rau má (*Centella asiatica*) là ba loại thảo dược dễ tìm có sẵn tại địa phương đã được nghiên cứu và thử nghiệm trong những năm gần đây như giải pháp trong tiêu diệt *V. parahaemolyticus* cũng như gia tăng sự chống chịu của tôm với điều kiện môi trường bất thuận [7]. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hiệu quả diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của ba loại thảo dược được chiết xuất bằng qui trình tối ưu hóa.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại Khu thực nghiệm thuộc Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Quốc tế - Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Hoá chất và môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy và hoá chất sử dụng trong nghiên cứu là loại thương mại được cung cấp bởi Sigma-Aldrich (Dorset, Anh). Môi trường và hóa chất được chuẩn bị bằng nước khử ion và được khử trùng bằng phương pháp hấp (121°C, 15 phút) hoặc phương pháp lọc qua màng polypolyethersulphone cỡ 0,22 µm (Millipore, Anh).

2.2.2. *Vibrio parahaemolyticus* và phương pháp chuẩn bị dịch vi khuẩn

V. parahaemolyticus sử dụng trong nghiên cứu là chủng gây bệnh AHPND (đã kiểm tra bằng phương pháp PCR và được ký hiệu số 2187) có nguồn gốc được thu thập và phân lập từ các ao nuôi tôm ở miền Bắc Việt Nam và được cung cấp bởi Khoa Khoa học và Công nghệ, Đại học Suan Sunandha Rajabhat (Thái Lan). Vi khuẩn thuần chủng được duy trì định kỳ trên môi trường thạch tryptic soy agar (TSA) có bổ sung 1% NaCl. Các thí nghiệm trong nghiên cứu sử dụng dịch nuôi vi khuẩn được chuẩn bị theo phương pháp nuôi tăng sinh [8] với ba khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, cấy và nuôi (nhiệt độ 30°C, 150 vòng/phút) trong môi trường lỏng tryptic soy broth (TSB) có bổ sung 1% NaCl cho đến khi đạt giai đoạn hậu pha cấp số. Nồng độ dịch vi khuẩn (CFU.mL⁻¹) được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở 600 nm và so sánh với đường chuẩn sinh trưởng. Đường chuẩn được xây dựng bằng cách pha loãng theo dãy nồng độ và tính toán đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) sau khi nuôi cấy trên môi trường thạch Mueller Hinton (MH) ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Tế bào vi khuẩn được thu bằng phương pháp ly tâm (2.000 G, 10 phút, nhiệt độ 4°C) và rửa sạch 2 lần bằng dung dịch đệm phosphate-buffered saline (PBS), sau đó được pha đến nồng độ CFU.mL⁻¹ cần sử dụng.

2.2.3. Quy trình chuẩn bị dịch chiết các loại thảo dược

Dịch chiết của ba loại thảo dược: i) trầu không (*P. betle*); ii) húng quế (*O. basilicum*); iii) rau má (*C. asiatica*) được chuẩn bị theo quy trình thông thường [9]. Cụ thể, thảo dược tươi được loại bỏ cành thừa, rửa sạch, cắt nhỏ, sấy khô (nhiệt độ 50°C, 24 giờ), nghiền và sàng nhằm thu bột mịn. Bột thảo dược tiếp tục được ngâm với ethanol 95% (tỷ lệ mẫu : dung môi là 1 g : 40 mL) trong 7 ngày. Dịch ngâm được làm sạch bằng phương pháp ly tâm (5.000 vòng/phút, 15 phút) và lọc với giấy Whatman kích cỡ 42 µm (3 lần). Máy cô quay chân không Hei-VAP Precision (Heildolph, Đức) được sử dụng để loại bỏ dung môi (75°C, 4 giờ). Dịch chiết được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng.

Từ quy trình gốc ở trên, các thí nghiệm tối ưu hóa được tiến hành theo phương pháp của Nguyen và cs (2024) [10] bằng cách thay đổi lần lượt các điều kiện chiết xuất (như mô tả ở mục 2.3.1). Quy trình chiết xuất tối ưu có thể chiết xuất nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học cao nhằm nâng cao khả năng diệt khuẩn của dịch chiết.

2.3. Thiết kế và bố trí thí nghiệm

2.3.1. Xác định các điều kiện chiết xuất tối ưu cho thảo dược

Thí nghiệm 1: Xác định nồng độ dung môi tối ưu

Bốn nồng độ ethanol (30, 50, 70, 95%) được sử dụng để xác định nồng độ dung môi tối ưu của quy trình chiết xuất cho ba loại thảo dược. Ngoài trừ việc thay đổi nồng độ dung môi, các thông số khác của quy trình được tiến hành như mô tả ở mục 2.2.3. Các thí nghiệm được tiến hành với ba lần lặp lại. Dịch chiết được đánh giá hiệu quả tiêu diệt *V. parahaemolyticus* thông qua chỉ tiêu đường kính vòng vô khuẩn (zone diameter of inhibition - ZDI). Đây là cơ sở để lựa chọn nồng độ dung môi tối ưu và sử dụng cho các thí nghiệm tối ưu hóa tiếp theo [10].

Thí nghiệm 2: Xác định thời gian ngâm tối ưu

Bốn thời gian ngâm thảo dược trong dung môi (3, 5, 7, 9 ngày) được thử nghiệm để xác định thời gian tối ưu cho quy trình chiết xuất. Ngoài trừ việc

thay đổi thời gian ngâm và sử dụng nồng độ dung môi tối ưu đã được xác định ở thí nghiệm 1 (như mô tả ở mục 2.2.3). Các thí nghiệm được tiến hành với ba lần lặp lại. Thời gian ngâm của nghiệm thức có dịch chiết thảo dược nâng cao hiệu quả tiêu diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thông qua chỉ tiêu ZDI được lựa chọn cho các thí nghiệm tối ưu hóa tiếp theo [10].

Thí nghiệm 3: Xác định tỷ lệ tối ưu giữa khối lượng mẫu : dung tích dung môi

Bốn tỷ lệ giữa khối lượng mẫu thảo dược : dung tích dung môi (1 g : 10 mL, 1 g : 20 mL, 1 g : 30 mL, 1 g : 40 mL) được bố trí thí nghiệm để xác định tỷ lệ tối ưu cho quy trình chiết xuất. Ngoài trừ việc thay đổi tỷ lệ mẫu : dung môi, thí nghiệm 3 sử dụng nồng độ dung môi và thời gian ngâm tối ưu đã được xác định ở các thí nghiệm 1 và 2. Các thông số còn lại của quy trình ở thí nghiệm 3 được tiến hành như mô tả ở mục 2.2.3. Các thí nghiệm được tiến hành với ba lần lặp lại. Tỷ lệ mẫu : dung môi của nghiệm thức có dịch chiết thảo dược giúp nâng cao hiệu quả tiêu diệt *V. parahaemolyticus* thông qua chỉ tiêu đánh giá là ZDI được lựa chọn cho quy trình chiết xuất tối ưu [10].

2.3.2. Đánh giá hiệu quả diệt vi khuẩn V. parahaemolyticus của các loại thảo dược sử dụng quy trình chiết xuất tối ưu

Thí nghiệm đánh giá hiệu quả diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của các loại thảo dược sử dụng quy trình chiết xuất kết hợp 3 thông số tối ưu ở mục 2.3.1: Nồng độ dung môi, thời gian ngâm và tỷ lệ mẫu : dung môi. Ba loại thảo dược (trầu không, húng quế, rau má) chiết xuất bằng quy trình đã được tối ưu và được so sánh với dịch chiết sử dụng quy trình chưa được tối ưu mô tả ở mục 2.2.3 (đối chứng). Hiệu quả diệt *V. parahaemolyticus* của các dịch chiết được đánh giá dựa vào 4 chỉ tiêu: i) ZDI; ii) nồng độ ức chế tối thiểu (MIC); (iii) nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC); iv) khả năng diệt vi khuẩn đang trong giai đoạn tăng sinh.

2.4. Các chỉ tiêu khảo sát

2.4.1. Đường kính vòng vô khuẩn (ZDI)

Dịch chiết thảo dược thu được từ các thí nghiệm được đánh giá khả năng diệt *V. parahaemolyticus* thông qua phương pháp khuếch

tán thảo được qua đĩa giấy của Kirby-Bauer [11]. Dịch chiết được chuẩn bị ở nồng độ 100 ppm và được pha loãng đến nồng độ cần thiết cho thí nghiệm. Sau đó, các đĩa giấy Whatman vô trùng (cỡ số 3) được thấm đều với dịch chiết tương ứng nhằm tải lượng dịch tương đương 10 µg/đĩa giấy và để khô tự nhiên. Đĩa giấy đã thấm dịch chiết được đặt trên đĩa thạch MH đã trải sẵn vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (10^7 CFU.mL⁻¹) và được ủ ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Sau khi ủ, ZDI trên đĩa thạch tạo ra do hiện tượng vi khuẩn bị ức chế hay tiêu diệt bởi hoạt tính của thảo dược được đo theo đơn vị milimét bằng thước đo kỹ thuật Mitutoyo 527-121.

2.4.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Giá trị MIC được xác định bằng phương pháp vi pha loãng theo qui trình chuẩn của CLSI nhằm xác định mức độ ức chế của thảo dược trên *V. parahaemolyticus* tương ứng với từng nồng độ cụ thể, do đó không phân tích so sánh sai khác thống kê giữa các nồng độ thí nghiệm [12]. Mỗi dịch chiết thảo dược được pha nồng độ khác nhau trong đĩa ELISA 96 giếng đáy phẳng để có được dãy nồng độ cuối cùng là 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 ppm với thể tích là 100 µL/giếng bằng kỹ thuật pha loãng nối tiếp để đảm bảo dung dịch sau có nồng độ gấp đôi dung dịch trước. Sau đó, 5 µL dịch gốc vi khuẩn ban đầu (10^7 CFU.mL⁻¹) được cho vào tất cả các giếng khảo sát. Đĩa được phủ kín bằng parafilm và ủ (nhiệt độ 30°C, 24 giờ). Sau thời gian ủ, nồng độ dịch chiết thấp nhất ức chế được sự tăng trưởng của vi khuẩn trong mỗi dãy nồng độ khảo sát được xác định là giá trị MIC. Đối chứng dương được bố trí chứa môi trường MH lỏng và cho cùng lượng vi khuẩn ban đầu để ủ. Đối chứng âm bao gồm các giếng chứa lượng ethanol tương đương nhằm thay thế cho môi trường dinh dưỡng và cũng được cho vào cùng lượng vi khuẩn ban đầu. Các giếng có chứa môi trường MH lỏng nhưng không cho dịch vi khuẩn cũng được chuẩn bị để kiểm soát tình trạng nhiễm khuẩn.

2.4.3. Xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC)

Giá trị MBC được xác định bằng phương pháp trải đĩa theo qui trình chuẩn của CLSI nhằm xác

định mức độ diệt khuẩn *V. parahaemolyticus* của thảo dược tương ứng với từng nồng độ cụ thể, do đó không phân tích so sánh sai khác thống kê giữa các nồng độ thí nghiệm [13]. Dãy nồng độ khảo sát được miêu tả ở mục khảo sát MIC, 20 µL dịch từ tất cả các giếng không có dấu hiệu tăng trưởng vi khuẩn sau 24 giờ ủ được trải và tiếp tục nuôi trên môi trường thạch MH (nhiệt độ 30°C, 24 giờ). Nồng độ dịch chiết thấp nhất diệt được 99,9% vi khuẩn gốc ban đầu được xác định là MBC.

2.4.4. Khả năng diệt *V. parahaemolyticus* đang trong giai đoạn tăng sinh

Dịch chiết thảo dược từ qui trình chiết xuất tối ưu cũng được đánh giá khả năng diệt vi khuẩn đang trong giai đoạn tăng sinh. Cụ thể, lượng 5×10^7 CFU.mL⁻¹ của dịch khuẩn gốc được bố trí trong bình tam giác 100 mL có chứa môi trường TSA và được ủ ở nhiệt độ 30°C và lắc ở tốc độ 150 vòng/phút để vi khuẩn phát triển trong 24 giờ. Tiếp đến, 2 ppm dịch chiết thảo dược (mức MIC cao nhất của các dịch chiết thảo dược được xác định từ kết quả của mục 2.4.2) được bổ sung vào bình tam giác nhằm đánh giá khả năng diệt khuẩn đang ở giai đoạn tăng sinh. Lượng vi khuẩn đang tăng sinh có trong từng bình được xác định định kỳ sau mỗi 24 giờ và kéo dài trong 48 giờ bằng phương pháp đếm khuẩn lạc sau khi nuôi cấy trên môi trường thạch MH (nhiệt độ 30°C, 24 giờ) [8]. Đối chứng là vi khuẩn đang tăng sinh và không được xử lý với dịch chiết.

2.5. Phân tích thống kê

Giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của các chỉ tiêu thu thập được tính toán bằng phần mềm Excel (Microsoft 365 for macOS). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) của các nghiệm thức được phân tích bằng phương pháp ANOVA một yếu tố và thử nghiệm Duncan sử dụng phần mềm SPSS 25 cho hệ điều hành macOS.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Điều kiện chiết xuất tối ưu cho thảo dược

3.1.1. Nồng độ dung môi tối ưu

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ ethanol 70% có thể chiết xuất dịch thảo dược cho kích thước ZDI (trần không: $34,0 \pm 0,38$ mm; húng quế:

33,9 ± 0,96 mm; rau má: 29,6 ± 0,62 mm) lớn hơn mm; rau má: 22,8 ± 0,31 mm). Tuy nhiên, các nồng độ ethanol thấp hơn (30 và 50%) không giúp nâng cao ZDI ($P > 0,05$), trừ trường hợp nồng độ 50% ở trầu không (Bảng 1)

Bảng 1. Đường kính vòng vô khuẩn (ZDI) của các nghiệm thức sử dụng nồng độ dung môi khác nhau (30, 50, 70, 95%) trong quá trình tối ưu hoá qui trình chiết xuất ba loại thảo dược (trầu không, húng quế và rau má)

Dịch chiết	Nồng độ dung môi (%)			
	30	50	70	95
Trầu không	20,2 ± 0,97 ^d	31,3 ± 0,81 ^b	34,0 ± 0,38 ^a	25,5 ± 1,55 ^c
Húng quế	25,0 ± 1,00 ^b	25,9 ± 1,27 ^b	33,9 ± 0,96 ^a	24,6 ± 0,65 ^b
Rau má	22,1 ± 0,35 ^b	22,3 ± 1,88 ^b	29,6 ± 0,62 ^a	22,8 ± 0,31 ^b

Ghi chú: Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) giữa các nghiệm thức.

3.1.2. Thời gian ngâm tối ưu

Thời gian ngâm 7 ngày có thể chiết xuất dịch thảo dược cho kích thước ZDI khi thử với *V. parahaemolyticus* (trầu không: 35,9 ± 1,50 mm; húng quế: 33,8 ± 2,44 mm; rau má: 33,5 ± 1,51 mm) lớn hơn ($P < 0,05$) so với các nghiệm thức ngâm có thời gian ngắn hơn (3 và 5 ngày). Tuy nhiên, thời gian ngâm 7 và 9 ngày không có kết quả ZDI sai khác có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) (Bảng 2).

Bảng 2. Đường kính vòng vô khuẩn (ZDI) của các nghiệm thức áp dụng thời gian ngâm khác nhau (3, 5, 7, 9 ngày) trong quá trình tối ưu hoá qui trình chiết xuất ba loại thảo dược (trầu không, húng quế và rau má)

Dịch chiết	Thời gian ngâm (ngày)			
	3	5	7	9
Trầu không	28,3 ± 1,25 ^c	32,8 ± 0,75 ^b	35,9 ± 1,50 ^a	35,8 ± 1,71 ^a
Húng quế	26,7 ± 1,70 ^c	31,9 ± 1,25 ^b	33,8 ± 2,44 ^a	34,6 ± 1,91 ^a
Rau má	23,8 ± 0,38 ^c	29,5 ± 1,96 ^b	33,5 ± 1,51 ^a	34,2 ± 0,35 ^a

Ghi chú: Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) giữa các nghiệm thức.

3.1.3. Tỷ lệ tối ưu giữa khối lượng mẫu: dung tích dung môi

Tỷ lệ tối ưu giữa khối lượng mẫu và dung tích dung môi là khác nhau khi chiết xuất các loại thảo dược. Đối với trầu không, tỷ lệ 1 : 30 tạo ra dịch chiết cho kích thước ZDI khi thử với *V. parahaemolyticus* (38,8 ± 1,29 mm) là cao nhất và sai khác có ý nghĩa thống kê so với các tỷ lệ còn lại ($P < 0,05$). Trong khi qui trình chiết xuất rau má, tỷ lệ 1 : 40 tạo ra dịch chiết cho kích thước ZDI (34,4 ± 1,16 mm) là lớn nhất và sai khác có ý nghĩa thống kê so với các tỷ lệ còn lại ($P < 0,05$). Đối với húng quế, tỷ lệ 1 : 30 và 1 : 40 đều cho kết quả ZDI tương đương nhau (37,4 ± 0,15 mm và 37,1 ± 1,03 mm) ($P > 0,05$) và sai khác có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ 1 : 10 và 1 : 20 ($P < 0,05$) (Bảng 3).

Bảng 3. Đường kính vòng vô khuẩn (ZDI) của các nghiệm thức áp dụng các tỷ lệ giữa khối lượng mẫu : dung tích dung môi khác nhau (1 : 10, 1 : 20, 1 : 30, 1 : 40) trong quá trình tối ưu hoá qui trình chiết xuất ba loại thảo dược (trầu không, húng quế và rau má)

Dịch chiết	Tỷ lệ khối lượng mẫu (g) : dung tích dung môi (mL)			
	1 : 10	1 : 20	1 : 30	1 : 40
Trầu không	29,8 ± 1,36 ^d	32,2 ± 1,49 ^c	38,8 ± 1,29 ^a	35,8 ± 0,25 ^b

Húng quế	29,2 ± 0,92 ^c	30,8 ± 1,79 ^b	37,4 ± 0,15 ^a	37,1 ± 1,03 ^a
Rau má	25,6 ± 1,65 ^d	27,1 ± 0,60 ^c	33,6 ± 0,81 ^b	34,4 ± 1,16 ^a

Ghi chú: Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P < 0,05) giữa các nghiệm thức.

3.2. Đánh giá hiệu quả diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của các loại thảo dược sử dụng qui trình chiết xuất tối ưu

3.2.1. ZDI, MIC và MBC

Thông số chiết xuất tối ưu được xác định từ thí nghiệm 1 - 3 được sử dụng để hình thành qui trình chiết xuất tối ưu, bao gồm: i) nồng độ ethanol: 70%; ii) thời gian ngâm: 7 giờ; iii) tỷ lệ mẫu (g) : dung môi (mL): 1 g : 30 mL áp dụng cho trầu không và húng quế; 1 g : 40 mL áp dụng cho rau má. Kết quả đánh giá cho thấy, dịch chiết của các loại thảo dược thu được khi áp dụng qui trình chiết xuất tối ưu đều có ZDI khi thử với *V. parahaemolyticus* (trầu không: 38,9 ± 1,88 mm; húng quế: 36,5 ± 1,10 mm; rau má: 34,2 ± 0,42 mm) lớn hơn có ý nghĩa thống kê (P < 0,05) so với dịch chiết áp dụng qui trình chưa tối ưu (trầu không: 25,7 ± 1,66 mm; húng quế: 23,4 ± 0,49 mm; rau má: 21,8 ± 0,55 mm). Ngoài ra, hiệu quả diệt vi khuẩn *V.*

parahaemolyticus của dịch chiết trầu không là cao nhất, tiếp đến là húng quế và rau má. Các khác biệt này đều có ý nghĩa thống kê (P < 0,05).

Kết quả cho thấy, việc tối ưu hóa qui trình chiết đã mang lại hiệu quả diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* cao hơn rõ rệt, với chỉ số ZDI trung bình gấp 1,5 lần so với qui trình chưa tối ưu. Ngoài ra, dịch chiết từ qui trình chiết xuất tối ưu có kết quả nồng độ ức chế và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của cả ba loại thảo dược đều giảm ½ so với nồng độ của dịch chiết từ qui trình chiết xuất chưa tối ưu. Kết quả này cho thấy tiềm năng tiết kiệm được lượng thảo dược cần sử dụng khi diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (Bảng 4). Khi so sánh với các loại thảo dược khác, hiệu quả diệt khuẩn của dịch chiết từ qui trình tối ưu cũng cao hơn hẳn, như so với chiết xuất thảo dầu (ZDI: 17 - 18 mm; MIC: 1,25 mg.mL⁻¹, MBC: 2,5 mg.mL⁻¹) [4].

Bảng 4. Đường kính vòng vô khuẩn (ZDI), nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của 3 dịch chiết thảo dược áp dụng qui trình chiết xuất chưa tối ưu và đã tối ưu: i) trầu không, ii) húng quế, iii) rau má

		Dịch chiết		
		Trầu không	Húng quế	Rau má
ZDI (mm)	Qui trình chưa tối ưu	25,7 ± 1,66 ^d	23,4 ± 0,49 ^e	21,8 ± 0,55 ^e
	Qui trình đã tối ưu	38,9 ± 1,88 ^a	36,5 ± 1,10 ^b	34,2 ± 0,42 ^c
MIC	Qui trình chưa tối ưu	1,0 ± 0,00	2,0 ± 0,00	2,0 ± 0,00
	Qui trình đã tối ưu	0,5 ± 0,00	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00
MBC	Qui trình chưa tối ưu	2,0 ± 0,00	4,0 ± 0,00	4,0 ± 0,00
	Qui trình đã tối ưu	1,0 ± 0,00	2,0 ± 0,00	2,0 ± 0,00

Ghi chú: Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong cùng cột và giữa các cột của chỉ tiêu ZDI thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P < 0,05) giữa nghiệm thức.

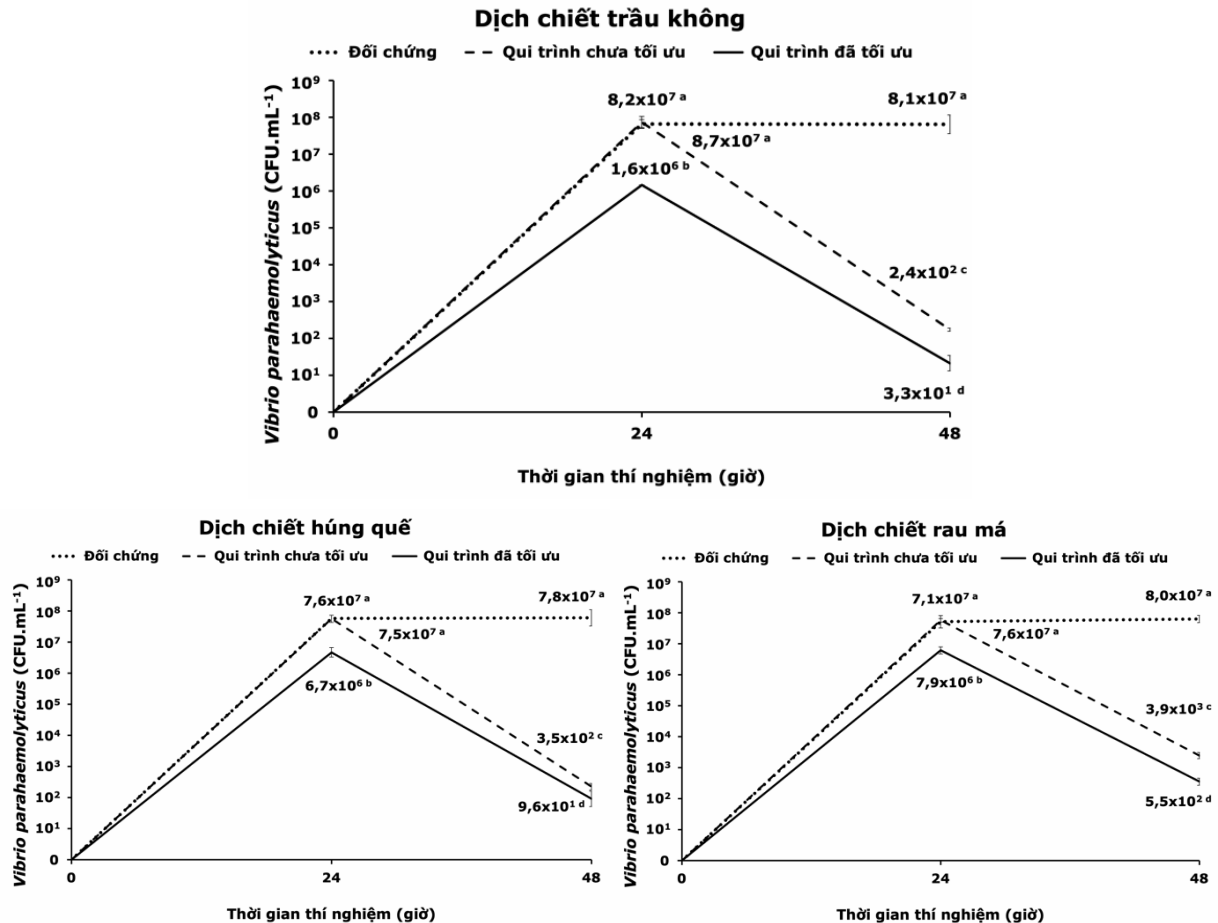
3.2.2. Khả năng diệt *V. parahaemolyticus* đang trong giai đoạn tăng sinh

Dịch chiết của ba loại thảo dược từ qui trình chiết xuất tối ưu đều giúp nâng cao khả năng diệt

vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đang trong giai đoạn tăng sinh. Lượng vi khuẩn trong các nghiệm thức có sử dụng dịch chiết thảo dược đều thấp hơn đáng kể và sai khác có ý nghĩa thống kê khi so

sánh với đối chứng ($P < 0,05$) ở thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Cụ thể, nồng độ của vi khuẩn ở thời điểm 24 giờ khi sử dụng dịch chiết từ qui trình chiết xuất tối ưu lần lượt như sau: trầu không: $1,6 \times 10^6$ CFU.mL⁻¹; húng quế: $6,7 \times 10^6$ CFU.mL⁻¹; rau má: $7,9 \times 10^6$ CFU.mL⁻¹. Các kết quả này thấp hơn đáng kể so với kết quả của nghiệm thức sử dụng qui trình chưa tối ưu (trầu không: $8,7 \times 10^7$ CFU.mL⁻¹; húng quế: $7,5 \times 10^7$ CFU.mL⁻¹; rau má: $7,6 \times 10^7$

CFU.mL⁻¹). Tương tự, kết quả ở thời điểm 48 giờ đối với dịch chiết từ qui trình chiết xuất tối ưu như sau: Trầu không: $3,3 \times 10^1$ CFU.mL⁻¹; húng quế: $9,6 \times 10^1$ CFU.mL⁻¹; rau má: $5,5 \times 10^2$ CFU.mL⁻¹. Kết quả này giảm đi khoảng 10 lần so với nghiệm thức sử dụng dịch chiết từ qui trình chưa tối ưu (trầu không: $2,4 \times 10^2$ CFU.mL⁻¹; húng quế: $3,5 \times 10^2$ CFU.mL⁻¹; rau má: $3,9 \times 10^3$ CFU.mL⁻¹) (Hình 1).



Hình 1. Khả năng diệt vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (chủng 2187 gây bệnh AHPND) đang trong giai đoạn tăng sinh của 3 dịch chiết thảo dược: i) trầu không (*Piper betle*), ii) húng quế (*Ocimum basillicum*), iii) rau má (*Centella asiatica*) khi so sánh giữa qui trình chiết xuất chưa tối ưu và đã tối ưu theo chỉ tiêu biến động về lượng khuẩn (CFU x mL⁻¹) trong 48 giờ khảo sát

Ghi chú: Giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n = 3$). Các chữ cái khác nhau trong cùng một hình thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) giữa các nghiệm thức.

4. THẢO LUẬN

Nghiên cứu gần đây trên đối tượng *Anthyllis henoniana* đã chỉ ra sự tương đồng giữa chỉ tiêu ZDI và hàm lượng các hợp chất có tính kháng khuẩn và chống oxy hóa [14]. Do đó, nghiên cứu này sử dụng ZDI làm chỉ tiêu đánh giá hiệu quả diệt khuẩn của

dịch chiết thảo dược. Kết quả từ qui trình chiết xuất tối ưu của nghiên cứu cho thấy sự tương đồng với các báo cáo gần đây trong nâng cao hàm lượng chất có hoạt tính sinh học, điển hình như: i) sử dụng ethanol với nồng độ 70% trong chiết xuất các hợp chất alkaloids, flavonoid và tannins từ cây húng quế Mỹ (*Ocimum americanum*) và mỏng toi củ

(*Anredera cordifolia*); ii) sử dụng thời gian ngâm là 7 ngày trong sản xuất dịch chiết cây muồng đen (*Cassia siamea*); iii) sử dụng tỷ lệ mẫu : dung môi là 1 : 30 và 1 : 40 trong chiết xuất cây Đẳng sâm (*Codonopsis pilosula*) [10].

Mặc dù nước là loại dung môi truyền thống thường được dùng trong nhiều nghiên cứu trước đây, dung môi hữu cơ như ethanol đã được chứng minh có hiệu quả trong việc loại thải các hợp chất gây nhiễu có bản chất là chất béo, đồng thời thu hút các cấu phần không phân cực có khả năng ức chế hoặc diệt vi khuẩn, từ đó giúp nâng cao đáng kể hiệu suất chiết xuất các hợp chất quý có khả năng tan trong ethanol. Tuy nhiên, nồng độ ethanol sử dụng quá cao hay quá thấp đều gây ảnh hưởng tiêu cực lên quá trình chiết xuất. Việc sử dụng ethanol nồng độ cao đến 95% làm giảm mạnh khả năng phân cực của dung môi và dẫn đến giảm khả năng thu hút các hợp chất phân cực cao, trong đó có phần lớn các chất có khả năng kháng khuẩn. Ngược lại, ở nồng độ quá thấp, quá trình chiết xuất lại tạo ra hiện tượng đóng màng gồm dày chứa nhiều tạp chất, từ đó giới hạn hiệu quả chiết [15]. Đây cũng là hiện tượng quan sát được trong nghiên cứu này khi sử dụng cồn nồng độ 30%. Tiếp đến, thời gian ngâm mẫu trong dung môi dài hơn cho phép tăng khả năng và cơ hội tiếp xúc và hòa tan giữa các chất có hoạt tính sinh học cao và dung môi, từ đó tăng cường hiệu quả thu hồi chất quý. Nghiên cứu khảo sát thời gian ngâm tối ưu nhằm thu dịch chiết từ một số loại thảo dược như cây cốt khí muồng (*Cassia occidentalis*), chà là sa mạc (*Balanites aegyptiaca*) và rau sam (*Portulaca oleracea*) đã kết luận, thời gian ngâm càng dài (trên 6 giờ) càng mang lại hiệu quả tiêu diệt nhân tố gây bệnh (*Colletotrichum graminicola* và *Phoma sorghina*) trên lúa miến (*Sorghum bicolor*) [16].

Tỷ lệ giữa khối lượng thảo dược trên thể tích dung môi cũng có ảnh hưởng lớn đến quá trình thu hồi các hợp chất có hoạt tính sinh học. Tỷ lệ này càng nhỏ (1 : 30 và 1 : 40), đồng nghĩa với thể tích dung môi càng nhiều, thì hiệu suất thu chất quý từ thảo dược càng gia tăng khi so sánh với những tỷ lệ cao hơn (1 : 10 và 1 : 20) [17]. Tuy nhiên, việc sử dụng quá nhiều dung môi cũng

mang lại nguy cơ làm loãng đi lượng chất quý thu được của từng loại thảo dược. Một số nghiên cứu về chiết xuất các hợp chất có tính kháng khuẩn và chống oxy hóa như polyphenol và flavonoid, do đó việc dùng tỷ lệ giữa mẫu và dung môi cao giúp thu được hiệu suất chiết tối ưu là 1 : 10 cho trường hợp của cây hắc mai biển (*Hippophae rhamnoides*), hay 1 : 20 cho trường hợp của cây diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus niruri*). Nhưng các nghiên cứu khác với mục đích và bố trí tương tự tiến hành trên cây ô liu (*Olea europaea*) lại cho tỷ lệ tối ưu thấp hơn là 1 : 30, hay tỷ lệ 1 : 40 trên cây đậu châu Phi (*Parkia biglobosa*) [18].

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được 3 điều kiện chiết xuất tối ưu cho ba loại thảo dược là trâu không (*P. betle*), húng quế (*O. basilicum*) và rau má (*C. asiatica*) lần lượt là: 1) nồng độ ethanol: 70%; 2) thời gian ngâm: 7 giờ; 3) tỷ lệ mẫu (g) : dung môi (mL): 1 g : 30 mL áp dụng cho trâu không và húng quế; 1 g : 40 mL áp dụng cho rau má. Dịch chiết thảo dược từ qui trình chiết xuất tối ưu có khả năng nâng cao hiệu quả tiêu diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* so với dịch chiết từ qui trình chưa tối ưu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Thị Huyền, Vũ Xuân Nghị, Lê Đặng Lâm Oanh, Đặng Lệ Quỳnh, Lê Thị Tuyết Mai, Phạm Thị Tâm, Đồng Văn Quyền, Vũ Thị Bích Huyền (2022). Tính kháng khuẩn sinh của *Vibrio* spp. phân lập từ nước nuôi thủy sản ở một số khu vực miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, 131(1C): 83 - 93. <https://doi.org/10.26459/hueunijns.v131i1c.6898>.
2. Othman, A. B., Saad, Z., Haiha, N., Yusof, N., Zahrah, S., Othman, A. (2018). *In vitro* antimicrobial activity of betel, *Piper betle* leaf extract against *Vibrio alginolyticus* isolated from Asian sea bass, *Lates calcarifer*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 46 - 48. <https://doi.org/10.7324/jabb.2018.60409>.
3. Fadel, A., Khafage, A., Abdelsalam, M., Abdel-Rahim, M. M. (2025). Comparative evaluation of three herbal extracts on growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus*

- vannamei*. *BMC Vet Res.*, 21(1): 166. Doi: 10.1186/s12917-025-04588-0. PMID: 40082886; PMCID: PMC11905464.
4. Hồng Mộng Huyền, Võ Tấn Huy, Trần Thị Tuyết Hoa (2018). Hoạt tính kháng khuẩn của một số cao chiết thảo dược kháng vi khuẩn gây bệnh ở tôm nuôi. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 54(Chuyên đề Thủy sản): 143 - 150. <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2018.047>.
5. Ta P. V (2022). Nghiên cứu khả năng sử dụng thảo dược để phòng trị bệnh gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Tạp chí Khóa học Quốc tế AGU, Trường Đại học An Giang*, 30(1): 62 - 70.
6. Võ Thị Tú Anh, Trần Chí Linh, Đỗ Minh Kha, Đái Thị Xuân Trang (2022). Tối ưu hóa qui trình chiết xuất cao chiết giàu polyphenol và flavonoid có hoạt kháng vi khuẩn *Vibrio* spp. từ lá cây núc nác (*Oroxylum indicum* L.). *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 58 (Số chuyên đề: Khoa học tự nhiên), 102 - 113. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2022.126>.
7. Lê Nguyễn Thiên Phúc, Nguyễn Minh Thành (2022). Đánh giá hiệu quả của các loại dịch chiết thảo dược trong việc nâng cao khả năng chống chịu của tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 14(2): 54 - 60.
8. Le, P. N. T., Desbois, A. P (2017). Antibacterial effect of eicosapentaenoic acid against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*: Killing kinetics, selection for resistance, and potential cellular target. *Marine Drugs*, 15(11): 334. <https://doi.org/10.3390/md15110334>.
9. Lê Nguyễn Thiên Phúc, Nguyễn Minh Thành (2022b). Đánh giá ảnh hưởng của các loại thảo dược lên tăng trưởng, tỷ lệ sống và chất lượng thịt của tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 8(2): 73 - 80.
10. Nguyen, A. D. X.; Le U. P.; Nguyen N. B. P.; Le P. N. T.; Le P. H (2024). Determination of optimal conditions for the enhancement in saponins extraction from Dang Sam (*Codonopsis pilosula* Nannf.). *Kỷ yếu Hội nghị Khoa học toàn quốc về Công nghệ Sinh học năm 2024*. Nxb Đại học Huế.
11. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., Turck, M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4): 493 - 496. PMID: 5325707.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard M07-A8. *CLSI: Wayne, PA, USA*.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, Approved Guideline M26-A Vol. 19, No. 18. *CLSI: Wayne, PA, USA*.
14. Ayachi, A., Younes, A. B., Ammar A. B., Bouzayani, B., Samet, S., Siala, M., Trigui, M., Treilhou, M., Tene, N. & Mezghani-Jarraya, R. (2023). Effect of the harvest season of *Anthyllis henoniana* stems on antioxidant and antimicrobial activities: Phytochemical profiling of their ethyl acetate extracts. *Molecules*, 28: 3947. [10.3390/molecules28093947](https://doi.org/10.3390/molecules28093947).
15. Love, J., Simons, C. R (2020). Acid hydrolysis of saponins extracted in tincture. *PLoS One*, 15(12): e0244654.
16. Schémaeza, B., Irénée, S., Elisabeth, Z., Paco, S (2012). Efficacy of plant extracts and effect of seed soaking duration on treatment of sorghum seed naturally infected by *Colletotrichum graminicola* and *Phoma sorghina*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(12): 1405 - 1410.
17. Amirullah, N. A., Abdullah, E., Abidin, N. Z., Abdullah, N., Manickam, S (2023). Influence of extraction technologies on the therapeutic properties of *Pleurotus* spp. (oyster mushrooms) – A critical review. *Food Bioscience*, 56: 103352. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103352>.
18. Hartanti, D., Insani, A. A., Wahono, S. K., Hamad, A (2024). Extraction method and crude drug-to-solvent ratio effects on the antioxidant properties and physicochemical profile during storage of a polyherbal formulation extract. *BIO Web of Conferences*, 135: 06002.

EVALUATION OF THE ENHANCEMENT IN ANTIBACTERIAL CAPABILITY OF HERBS AGAINST *Vibrio parahaemolyticus* USING OPTIMIZED EXTRACTION PROCESS**Le Nguyen Thien Phuc¹, Nguyen Minh Thanh¹**¹ *International University, Vietnam National University of Ho Chi Minh City***Abstract**

This study evaluated the antibacterial capability of three optimized herbal extracts against *Vibrio parahaemolyticus*, including *Piper betle*, *Ocimum basilicum* and *Centella asiatica*. The optimization was carried out on three extracting conditions: i) ethanol concentration (30, 50, 70, 95%); ii) soaking duration (3, 5, 7, 9 days); and iii) ratio of sample (g) & solvent (mL) (1:10, 1:20, 1:30, 1:40). Results identified the optimal procedure as follows: (i) ethanol concentration of 70%, soaking duration of 7 days, 1:30 ratio for *Piper betle* and *Ocimum basilicum*, 1:40 ratio for *Centella asiatica*. The optimized extracts were then compared with the unoptimized ones for zone diameter of inhibition (ZDI), minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and the bacteriacidal capability on enumeration culture. Optimized extracts improved ZDI against *V. parahaemolyticus* by 1.5 times ($P < 0,05$), together with MIC and MBC by 2 times. Moreover, optimized extracts also reduced the bacterial number in enumeration culture by 10 times ($P < 0,05$) in comparison with the unoptimized ones. Therefore, this study indicated the enhancement in antibacterial capability of the optimized herbal extracts and also highlighted their potential use in *V. parahaemolyticus* treatment.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, herbs, extraction, optimization.**Ngày nhận bài:** 21/7/2025**Ngày chuyển phản biện:** 20/8/2025**Ngày thông qua phản biện:** 6/12/2025**Ngày duyệt đăng:** 16/12/2025